[UCI]I804:24011-200000232845

2006年 2月

碩士學位 論文

김치로부터 *exopolysaccharide* 생성 유산균의 분리 및 특성 규명

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

金 孝 珠

김치로부터 *exopolysaccharide* 생성 유산균의 분리 및 특성 규명

Isolation and characterization of the exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from kimchi

*2006*年 2月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

金 孝 珠

김치로부터 *exopolysaccharide* 생성 유산균의 분리 및 특성 규명

指導敎授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

*2005*年 *10*月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

金 孝 珠

金孝珠의 碩士學位論文을 認准함

委員長　조선대학교 교수　_____ 印

委　員　조선대학교 교수　_____ 印

委　員　조선대학교 교수　_____ 印

2005 年　11 月　　日

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT……Ⅵ
LIST OF FIGURE……Ⅲ
LIST OF TABLE……Ⅴ

제 *1* 장 서 론……1

제 *2* 장 실험재료 및 방법……5

1. EPS 생성균주의 분리 ……5
2. EPS 생성균주의 동정 ……5
3. EPS 생성균주의 특성 ……9
   1) 배양시간에 따른 생육도 ……9
   2) 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도 ……9
   3) 배지의 초기 pH에 따른 생육도 ……9
4. 분리균주의 장내 정착성 확인 ……10
   1) 내산성 및 인공위액 저항성 ……10
   2) 인공담즙 저항성 ……10
5. EPS의 분리 ……11
   1) EPS ……11
   2) 정제 ……11
6. EPS의 특성 ……12
   1) 총 당 측정 ……12

2) 총 단백질 측정 ……12
3) 구성 당 확인 ……12
4) 점도 ……15

제 3 장 결과 및 고찰……12

1. EPS 생성균주의 분리 ……16
2. EPS 생성균주의 동정……18
3. EPS 생성균주의 특성……26
   1) 배양시간에 따른 생육도 ……26
   2) 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도……26
   3) 배지의 초기 pH에 따른 생육도……27
4. 분리균주의 장내 정착성 확인 ……31
   1) 내산성 및 인공위액 저항성 ……31
   2) 인공담즙 저항성 ……35
5. EPS의 특성 규명……39
   1) 분리 및 정제 ……39
   2) 구성 당 확인 ……42
   3) 점도 ……45

제 4 장 결 론……48

제 5 장 참고문헌……50

LIST OF FIGURE

Figure 1. 16S rDNA sequencing procedure for the isolation of strains ……8

Figure 2. Isolation of EPS producing LAB from kimchi ……17

Figure 3. Gram staining of the isolated strains ……20

Figure 4. DNA sequence of the amplified 16S rDNA from isolate GJ2 ……22

Figure 5. DNA sequence of the amplified 16S rDNA from isolate C3 ……23

Figure 6. DNA sequence of the amplified 16S rDNA from isolate C11 ……24

Figure 7. Phylogenetic relationship between *Leuconostoc kimchii* GJ2, *Leuconostoc citreum* C3, *Leuconostoc mesenteroides* C11 and other related bacteria based on 16S rDNA sequence ……25

Figure 8. Growth curves *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 in MRS broth at 30℃ ……28

Figure 9. Effects of NaCl of the growth media on the growth of *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 ……29

Figure 10. Effects of initial pH of the growth media on the growth of *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 ……30

Figure 11. Acid tolerance of the EPS producing isolates in 0.05 M sodium phosphate (pH 3.0) ……33

Figure 12. Survival of the EPS producing isolates in artificial gastric juice of pH 3.0……34

Figure 13. Bile resistance of the EPS producing isolates against 0.3% oxgall ……36

Figure 14. Bile resistance of the EPS producing isolates against 0.5% oxgall ……37

Figure 15. Bile resistance of the EPS producing isolates against 0.3% oxgall after treatment for 2 hours in artificial gastric juice of pH 3.0……38

Figure 16. Thin layer chromatogram after acid hydrolysis of the EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 ……43

Figure 17. HPLC chromatogram after acid hydrolysis of the EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 ……44

LIST OF TABLE

Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification of 16S rDNA ……7

Table 2. Operating conditions of HPLC analysis for sugar composition determination of EPS ……14

Table 3. Morphological and cultural characteristics of isolate strains GJ2, C3 and C11 ……19

Table 4. Sugar utilization characteristics of the isolated strains GJ2, C3 and C11 ……21

Table 5. EPS production by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 in 50 mL sucrose broth at 30℃ for 48 hours……41

Table 6. Viscosity of the fermentation medium and EPS solution by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 in 50 mL sucrose broth at 30℃ for 48 hours……47

ABSTRACT

Isolation and characterization of the exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from kimchi

Kim, Hyo-Ju
Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.
Department of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun University

Lactic acid bacteria isolated from kimchi were screened for exopolysaccharides(EPS) production. Three lactic acid bacteria were able to produced EPS from sucrose media. The selected strains were identified as *Leuconostoc kimchii, Leuconostoc citreum, Leuconostoc mesenteroides* strains GJ2, C3 and C11 by using Biolog test and 16S rDNA sequencing. In the viability tests in the presence of artificial gastric juice or bile, the isolated *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 showed high viability(maintain initial viable cell, 10^8 CFU/mL) for 2 hours in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 3.0), in artificial gastric juice and for 24 hours in artificial bile. In liquid media containing sucrose as carbone source, the amount of EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 was 21.49 g/L, 16.46 g/L and 22.98g/L, respectively. In the EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11, sugar comprised 96.48% w/w, 89.38% w/w and

91.05% w/w, respectively while the protein content was found to be 0.8% w/w, 0.9% w/w and 0.95% w/w for GJ2, C3 and C11 EPS, respectively. The sugar compositions of the EPSs were analyse by TLC and HPLC analysis from acid hydrolysis of the EPS. EPSs produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 contained only glucose. Viscosity of the 4% EPSs and purified EPSs solution were highest EPS produced by *Leu. citreum* C3(136.3cp and 3719cp, respectively) while lowest EPS produced by *Leu. mesenteroides* C11(3.57cp and 6.07cp, respectively). The viscosity results showed that the difference in viscosity of the EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 may be caused by the difference in molecular weight and structure of the EPSs.

제 1 장 서 론

유산균(lactic acid bacteria : LAB)은 자연계에 널리 분포하고 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 야채 등의 다양한 발효 가공에 종균으로 사용되어지고 있으며, 식품의 보존성 향상뿐만 아니라 관능적 특성 및 영양적 가치에도 기여하고 있다. 식품에서 유산균에 의한 젖산발효는 상큼한 향과 맛을 내게 하고 나아가 당, 유기산, 단백질 및 지방성분을 이용하여 독특한 향과 풍미성분으로 전환시키어 제품의 질 향상에 바람직한 역할을 하게 한다(38). 또한 일부의 유산균속에서는 exopolysaccharides(EPS)를 생합성하여 제품의 조직과 점성 향상에도 기여하고 있다(38). 유산균생성 EPS는 특히, 유산균 발효유제품에서 큰 문제점이었던 유청 분리현상을 완화시키고 점성을 증가시키며 조직을 부드럽게 하여 섭취 시 구강 내 포만감과 조직감을 부여해준다(1, 18). 따라서 서유럽 특히 프랑스, 덴마크, 네델란드 등에서는 발효유에 대한 안정제 대체원으로서 발효유제품의 종균으로 EPS생성 유산균들이 매우 오래전부터 사용되어왔다(9, 38, 39).

EPS는 세포벽의 일부로서 세포벽주위에 협막을 형성하거나 세포벽 외부에 slime형태로서 발효중에 축적되는 미생물 다당류로, 1차 또는 2차 대사산물이다(7). EPS는 에너지원으로 이용되는 것은 아니고 건조, 식균작용, 원생동물의 습식, 항생제, 독성화합물, 삼투압 스트레스 등과 같은 외부환경으로부터 자신을 보호하는 작용을 한다(12). 물에 녹거나 분산되는 긴 사슬의 고분자 중합체로서 식가공품에서 농후제나 겔링화에 중요한 역할을 한다. EPS는 실제적 측면에서 미생물이 가장 다량으로 생성하는 다당류이며, 배양액으로부터 회수가 쉽고, 정제비용이 적게 들므로 상업적인 잠재력이 가장 높은 다당류이다(17). 유산균에 의해 생성된 EPS는 그 균종에 따라 구성당의 종류와 비율이 서로 다르다는 것이 이미 보고 되어진바 있다(32, 33).

유산균생성 EPS의 분류는 homopolysaccharides와 heteropolysaccharides의 두 그룹

으로 구분되어진다(25, 30, 33, 38). Homopolysaccharides는 주로 fructose와 glucose와 같은 한 가지 형태의 단당으로만 구성되어 있는 것을 지칭하며, 그 종류로는 *Streptococcus salivarius*와 *Streptococcus mutans*에 의한 fructans type의 levan과 inulin이 있으며, glucans type으로 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*와 *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*에 의해 생산된 dextran과 *Leu. mesenteroides*에 의한 alternan 및 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*에 의해 생산된 mutan이 여기에 속한다(17, 40).

Heteropolysaccharides는 두 가지 또는 그 이상의 다른 종류의 단당들로 구성되어 있으며, 주요 구성당으로 glucose, galactose, fructose 및 rhamnose가 서로 다른 비율로 결합을 이루고 있다(32). 소수의 경우 N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, glucuronic acid와 phosphate, acetyl, glycerol과 같은 당이 아닌 물질들이 결합을 형성하는 경우도 있다(38, 39). 주로 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sake* 등의 중온성 유산균들과 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgalicus*, *Streptococcus thermophilus* 등의 고온성 유산균들에 의해 생산된다(31, 32). 현재 dextran, xanthan, gellan, pullulan, yeast glucans 등이 산업적으로 중요하게 사용되어지고 있는데, 특히 dextran은 석유회수 증진제, 유화제, 점착제, 물성 조절제, 혈장증량제 등에 오래전부터 사용되어 왔으며, 시럽과 캔디의 보습성 증진 및 설탕 결정 방지, 껌과 젤리의 젤화, 아이스크림의 빙결방지, 유체식품의 물성조절 등 식품공업에서도 활발히 이용되고 있다.(37, 40) 또한, *Xanthomonas canpestris*로부터 생산되는 xanthan과 *Sphingomonas pancimobilis*에서의 gellan은 식품에서 그 독특한 rheological특성 때문에 이미 미국 FDA(United States, Food and Drug Administration)로부터 식품첨가물로 사용이 허가되어 산업적으로 이용되어지고 있다(31, 32).

최근에 와서는 EPS가 과거의 단순 물성기능소재로써가 아니고 생체 중요 정보물질로서의 생리기능소재로서 주목받고 있다. 유산균중 *Bifidobacteria*의 EPS와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgalicus*, *Lactobacillus helverticus* var. *jugurti*로부터 유래한 EPS들이 항암효과가 있다고 보고 하였다(28). *Streptococci*로부터 생산된

EPS의 경우 면역학적 효과가 있다고 하였고, 항궤양 효과와 cholesterol저하 활성에 대한 보고도 있다(5). 지금까지 유산균으로부터 생성된 EPS에 관한 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 대부분의 연구가 요구르트와 치즈 등과 같은 발효유제품의 물성기능소재로서의 종균이용에 관한 것이거나 EPS생산 균주의 탐색이나 특성에 관한 연구도 거의 발효유제품에서 분리한 유산균에 국한되고 채소발효식품, 특히 김치에서 분리한 경우는 엄 등(14)에 의한 동치미에서의 고활성 dextransucrase를 생성하는 *Leuconostoc mesenteroides*와 김 등(4)이 보고한 김치로부터 dextran 생성 *Leuconostoc lactis*의 분리에 관한 보고정도이다.

김치는 배추나 무를 주원료로 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 일정기간 발효시킨 우리나라 고유의 발효식품이며, 이들 원료와 미생물의 작용에서 유래되는 성분이 잘 조화되어 고유의 맛을 나타내게 된다(41, 45). 이러한 채소발효식품과 관련된 미생물 중 유산균들은 그 영양학적 및 약리학적 장점들이 부각되고 있으며, 김치의 기능성과 효능에 관한 연구결과들이 활발하게 진행되면서 유산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있다. 김치발효과정에 관여하는 유산균은 유산과 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해 되지만 안정성이 높은 bacteriocin과 H_2O_2 및 diacetyl생성으로 인한 항균작용을 나타낸다(41). 또한 면역기능 강화(44), 혈중 cholesterol저하(24), 간 기능 항진작용(3), 항암작용(26), 항산화작용(27) 등의 다양한 건강 증진 기능이 보고 되고 있다. 최근에는 유산균 특징 중에 probiotics라는 기능적인 측면에 관심이 모아지고 있다. Probiotics는 살아있는 균주를 섭취한다는 점에서 항생제의 첨가로 야기될 수 있는 잔류 및 내성문제를 해결하는 항박테리아제로 장내 미생물군의 균총 유지와 대장균의 감소를 통한 성장촉진제라 할 수 있다(30, 41). 따라서 probiotics의 기능성을 지니는 유산균들을 김치 담금 시 종균으로 이용하면 장내 정착이 가능하여 정장작용을 높일 수 있을 것으로 생각되어진다.

본 연구에서는 EPS가 극한 생존환경에서 자기 방어 물질로서 작용하는 것에 착안하여 EPS생성 유산균이 낮은 pH의 위산에서와 소장에 분비된 담즙에서 생존하여 probiotics로 기능할 수 있을 것을 기대하여, 김치로부터 분리된 유산균 중 3종의 EPS 생성 유산균주를 선별하고 내산성, 인공위액 및 인공담즙 저항성 시험을 통하여 정장

의 효과 유무를 조사하였으며, 나아가 기능성 물질로서의 EPS를 분리, 정제하여 그 특성을 규명하고자 한다.

제 2 장 재료 및 방법

1. EPS 생성균주의 분리

김치로부터 분리되어 유산균으로 확인된 김치유산균주를 sucrose(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, dipotassium phosphate 5 g, diammonium citrate 5 g, sucrose 50 g /1 L, pH 7.0)고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양한 후, mucoid colony를 나타내는 점질균을 선정하고, 다시 sucrose 액체배지에서 점성물질을 분비하는 것을 확인하여 EPS 생성균주로 선정하였다. 분리 균주는 MRS(Difco, France) 액체배지에 배양한 후 대수기에 있는 배양액에 glycerol이 25%(v/v)가 되게 첨가하여 -70℃에서 보관하였으며, 실험에 사용할 경우 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 MRS액체배지에 1차 계대하고, 다시 sucrose 액체배지에 2차 계대하여 30℃에서 48시간 배양하여 사용하였다.

2. EPS 생성균주의 동정

분리된 EPS 생성균주는 그람염색(Gram stain kit, BD Co., USA)을 비롯한 형태학적 특성, API kit(50CHL, Biomérieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 16S rDNA 염기서열 분석을 위한 분리균으로부터의 genomic DNA 추출은 Genome DNA kit(Q-Biogene, USA)을 사용하였다. 분리균의 동정을 위한 16S rDNA 증폭용 primer는 유산균속 특이적 primer(Table 1)들을 사용하였다. PCR은 Palmcycler(Corbett Reaserch, Australia)을 사용하여 수행하였다. 온도조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation을 수행하고 95℃ 30초, 61℃ 30초,

72℃ 1분 30초의 과정을 30회 반복한 후, 72℃ 10분간 post-elongation을 실행하였다. PCR에 의하여 증폭된 단편은 Qiaquik gel extraction kit(Qiagen Co., Germany)을 사용하여 회수한 후 pGEM-T easy vector(Promega Co., USA)에 ligation하였다. *E. coli* TG1을 숙주세포로 사용하여 형질전환 하였으며, 항생제(ampicillin, 50 ㎍/mL)가 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37℃에서 12시간 평판배양하였다. LBAP 고체배지에 형성된 colony는 50 ㎍/mL의 ampicillin이 함유된 LB 액체배지에 37℃에서 12시간 진탕배양하여 Qiaprep spin miniprep kit(Qiagen Co., Germany)으로 plasmid DNA를 추출하였다. 재조합 plasmid는 제한효소 *EcoR*I (TaKaRa Co., Japan)으로 digestion하여 삽입된 단편의 크기를 확인한 후 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 상동성 검사는 GeneBank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program(16)에 의해 실행하였다.

Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification of 16S rDNA

Primers	*Oligonucleotide sequences(5′ → 3′)*
LeuP	Forward : GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
	Reverse : GACCCGGGAACGTATTCACCGCGGC

Genomic DNA extraction

↓

PCR amplification of 16S rDNA using LAB specific primer

↓

purification of PCR product

↓

PCR fragment ligation to pGEM-T Easy Vector

↓

transformation to the *E. coli* strain TG1

↓

incubation on LB plates containing 50 ㎍/mL ampicillin

↓

transformant toothpicking into LB broth containing 50 ㎍/mL ampicillin

↓

incubation for 12 hours at 37℃

↓

preparation of recombinant plasmid DNA

↓

confirmation of the insert DNA by digestion with restriction enzyme EcoR I

↓

get the sequence data commission to Korea Basic Institute

↓

sequence database searches in GeneBank using the program BLAST

Figure 1. 16S rDNA sequencing procedure for the isolation of strains

3. EPS 생성균주의 특성

1) 배양시간에 따른 생육도

분리균주의 배양시간에 따른 생육도를 조사하기 위하여 MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 36시간 정치배양 하면서 매 3시간마다 A_{600}에서 흡광도를 측정하여 변화를 조사하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 분리균주를 3번씩 배양하여 측정하였다.

2) 배지의 *NaCl* 농도에 따른 생육도

배지의 초기 NaCl 농도가 분리균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NaCl을 0, 1, 3, 5 및 7%(w/v)로 첨가한 MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양한 후 A_{600}에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 분리균주를 3번씩 배양하여 측정하였다.

3) 배지의 초기 *pH*에 따른 생육도

배지의 초기 pH가 분리균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 1 N NaOH 또는 1 N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 및 10.0으로 보정한 MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양한 후 A_{600}에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 분리균주를 3번씩 배양하여 측정하였다.

4. 분리균주의 장내 정착성

1) 내산성 및 인공위액 저항성

분리균주의 산 저항성 시험은 우선 단순 산성 pH에 대한 내성의 측정은 1 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정한 0.05 M sodium phosphate 용액 하에서 시행하였다(23). 인공위액 하에서의 저항성은 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액을 조제하여 실시하였다. 인공위액의 조제는 Kobayashi등의(29) 방법을 변형하여 1 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정한 MRS 액체배지에 pepsin(Sigma Co., USA)을 1,000 unit/mL 되도록 첨가하였다. EPS 생성을 위해 분리균주를 sucrose 액체배지에 1%(v/v)접종하여 30℃에서 48시간 배양한 후 원심분리(9,950×g, 5min)하여 상징액을 제거하고 균체를 회수한 다음 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액을 각각 상징액과 동량으로 첨가하여 30℃에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후 생균수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 비교하였다. 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정하였다. 대조군으로는 분리균주가 EPS를 생성하지 않은 상태로서 MRS 전 배양액 (30℃, 24시간)을 사용하여 동일하게 처리하였다.

2) 인공담즙 저항성

인공담즙의 조제는 MRS 액제배지에 0.45 ㎛ filter(Milipore Co., USA)로 여과 제균된 Oxgall(Sigma chemical Co., USA) 용액을 0.3%, 0.5%가 되도록 첨가하였다.(36) 분리균주의 인공담즙에 대한 내성은 sucrose 전 배양액과 인공위액에서 2시간 동안 배양한 배양액을 각각 원심분리(9,950×g, 5min)하여 상징액을 제거하고 균체를 회수한 후 인공담즙액을 상징액과 동량으로 첨가하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 생균수를 측정하여 인공담즙에 대한 저항성을 비교하였다. 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정하였다. 대조군으로는 분리균주가 EPS를 생성하지 않은 상태로서 MRS 전 배양액 (30℃, 24시간)을 사용하여 동일하게 처리하였다.

5. EPS의 분리

1) EPS

분리균주로부터 생성된 EPS의 분리는 균체 배양액을 4℃에서 원심분리(9,950×g, 25min)하여 균체를 제거하고, EPS를 침전시키기 위해 회수한 상징액에 2배량의 냉각된 95% 에탄올을 서서히 가하여 4℃에서 15시간 침전시켰다. 침전물은 원심분리(9,950×g, 25min, 4℃)하여 회수하고, 남은 에탄올을 건조시킨 후 동결건조(Samwon freezing engineering Co., Korea)하여 이를 crude EPS로 하였다(47).

2) 정제

분석을 위한 EPS의 정제과정은 다음과 같다. 균체배양액에 trichloloacetic acid(Sigma chemical Co., USA)를 최종농도가 4%(w/v)가 되도록 첨가하고 4℃에서 2시간 처리한 후 원심분리(9,950×g, 25min, 4℃)하여 균체와 침전된 단백질을 제거하였다. 상징액은 회수한 후 0.2 ㎛ filter(Milipore Co., USA)로 여과하여 남은 단백질을 제거하고, 2배량의 냉각된 95% 에탄올을 서서히 가하여 4℃에서 15시간 침전시켰다. 침전물은 원심분리(9,950×g, 25min, 4℃)하여 회수하고, 남은 에탄올을 건조시킨 후 3차 증류수에 용해하여 dialysis-sack(M.W. cut off 10,000, Spectra/Por 6 membrane, Spectrum Laboratories, USA)에 넣어 4℃, 24시간 동안 투석시킨 다음 동결건조 하였다(50).

*6. EPS*의 특성

1) 총 당

정제된 EPS의 총당 확인은 Dubois 등의(35) phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다. 물에 용해시킨 EPS용액 1 mL에 동량의 5%(w/v) phenol(Fluka Co., USA)을 가한 후 즉시 진한 황산 5 mL를 넣고 10분간 정치한 후 25℃ water bath에서 10분 처리하여 A_{490}에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각 3번씩 반응시켜 측정하였다. 표준물질로는 glucose를 사용하였다.

2) 총 단백질

EPS의 총 단백질은 Schacterle 및 Pollack(10)방법을 이용하여 측정하였다. 물에 용해시킨 EPS용액 1 mL에 동량의 alkaline copper용액을 넣고 10분간 정치한 후 phenol working solution 4 mL를 즉시 가하여 55℃ water bath에서 5분 처리한 후 즉시 식혀서 A_{650}에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각 3번씩 반응시켜 측정하였다. 표준물질로는 bovine albumin(Fraction V, Sigma)을 사용하였다.

3) 구성 당 확인

EPS의 구성 당을 확인하기 위하여 EPS 가수분해물을 제조 후 TLC 및 HPLC를 이용하여 분석하였다(37). EPS의 가수분해는 2 N 황산으로 100℃에서 3~6시간 동안 실시하였으며, 1 N NaOH로 중화하고 0.45 ㎛ filter(Milipore Co., USA)로 여과하여 시료로 사용하였다. TLC는 준비된 시료를 TLC plate(Whatman K5F, 150Å)에 1 μL 점적한 후 전개용매 acetone : butanol : water (4 : 5 : 2)로 2번 전개시킨 다음,

0.5%(w/v) α-naphthol과 0.5%(v/v)황산을 포함한 에탄올 용액에 담그고 건조시킨 후 120℃ 오븐에서 10분간 발색시켜 spot의 위치를 확인하였다(14). HPLC는 분석 column으로 carbohydrate analysis column(3.9 mm × 300 mm. Waters)을 사용하였으며 이동상으로는 80%(v/v) acetonitrile을 사용하였다. 이동상의 유속은 1.5 mL/min으로 하였으며, 시료는 autosampler(MIDAS 830)를 이용하여 20 μL 주입하여 RI(Regractive Index)검출기로 검출하였다.

Table 2. Operating conditions of HPLC analysis for sugar composition determination of EPS

Column	Carbohydrate analysis column(Waters)
Elute	Acetonitrile(80%, v/v)
Flow rate	1.5 mL/min
Detector	RI detector
Column temperature	35℃
RI detector temperature	35℃
Injection volume	20 μL

4) 점도

생성된 EPS의 점도는 Brookfield viscometer(LVDVⅡ+Pro, USA)에 small sample adapter를 부착하여 spindle No.18을 사용하여 측정하였다. 점도의 측정은 sucrose배양액의 상징액과 생징액을 에탄올 침전하여 회수한 crude EPS, 정제 EPS에 대하여 실시하였다. 에탄올 침전하여 회수한 crude EPS와 정제 EPS는 각각 3차 증류수 25 mL와 10 mL에 용해하여 측정하였다. 점도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각의 EPS를 3번씩 준비하여 측정하였다. 또한, EPS 생산량에 따른 점도의 차이에 대비하여 동일농도에 대해서도 측정을 수행하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. EPS 생성 균주의 분리

김치로부터 분리한 유산균 중에서 EPS 생성 균주를 선별하기 위해 sucrose 고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 그 결과 점질성 집락을 나타내는 균을 3종 분리하였다(Fig. 2). 분리한 3종의 분리균주는 편의상 GJ2, C3, C11이라 명칭하였다.

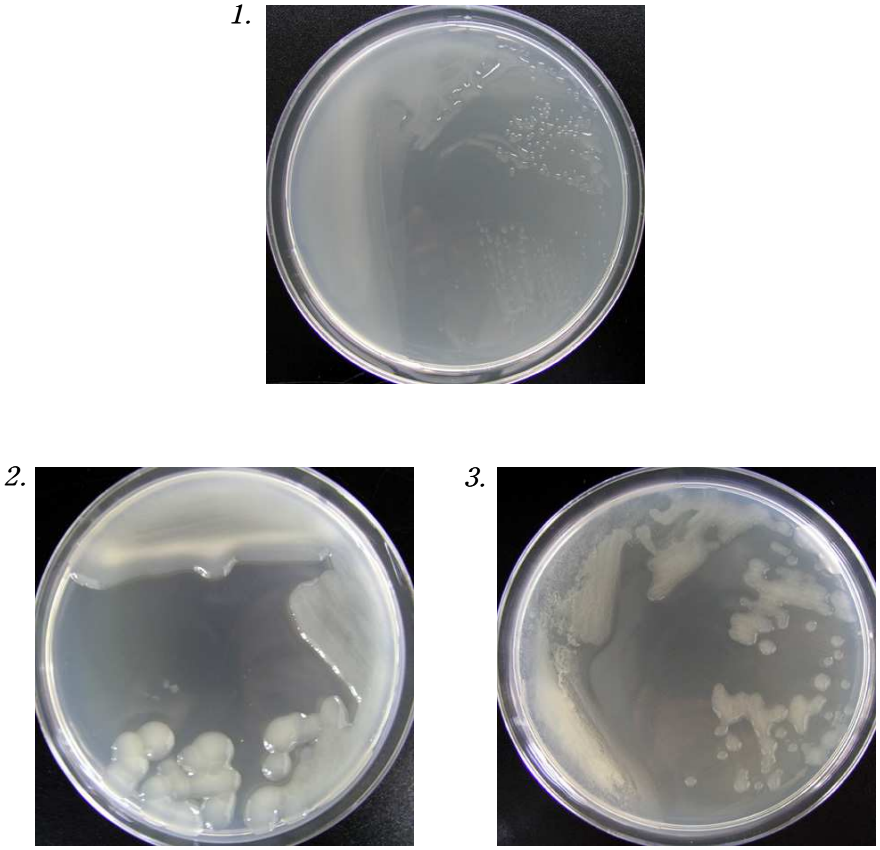

Figure 2. Isolation of EPS producing LAB from kimchi

1. Isolate GJ2 grown on sucrose medium containing 5% sucrose.
2. Isolate C3 grown on sucrose medium containing 5% sucrose.
3. Isolate C11 grown on sucrose medium containing 5% sucrose.

2. *EPS* 생성 균주의 동정

EPS 생성 분리균주의 형태학적, 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 결과는 다음과 같다. 분리균주들을 MRS배지에 접종하여 24시간 혐기 배양하고, Gram 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 (Table 3, Fig. 3) 3종 모두 그람양성 구균이었으며, colony는 둥근형으로 표면은 매끈하며 GJ2, C3는 우유빛을, C11은 흰색을 나타냈다. 생화학적 특성으로 API 50CHL kit을 사용하여 당 대사능을 검토한 결과는 Table 4에 나타내었다. 분리균주의 16S rDNA 염기서열은 GJ2는 총 1,306 bp를, C3는 총 1,359 bp를, C11은 총 1,359 bp를 결정한 후 읽어진 16S rDNA 서열분석은(Fig. 4-6) Blast program을 사용하여 상동성을 검색하였다. 분리균주 GJ2, C3, C11은 각각 *Leuconostoc kimchii* AF179386과 99%, *Leuconostoc citreum* AF111949와 99%, *Leuconostoc mesenteroides* AB023246과 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, Fig. 7에 16S rDNA 염기서열을 기초로 한 다른 bacteria와의 계통발생론적 관계를 나타내었다.

EPS 생성 분리균주 GJ2, C3, C11의 당 대사능을 포함한 일반적인 특성과 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 각각 *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었으며, 그 결과 GJ2, C3, C11을 각각 *Leuconostoc kimchii* GJ2, *Leuconostoc citreum* C3, *Leuconostoc mesenteroides* C11로 명명하였다.

Table 3. Morphological and cultural characteristics of isolated strains GJ2, C3 and C11

characteristics	*GJ2*	*C3*	*C11*
Gram-stain	+	+	+
Morphology	coccus	coccus	coccus
Colony	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	smooth
Colony color	milk color	milk color	white color
colony opacity	opaque	opaque	opaque

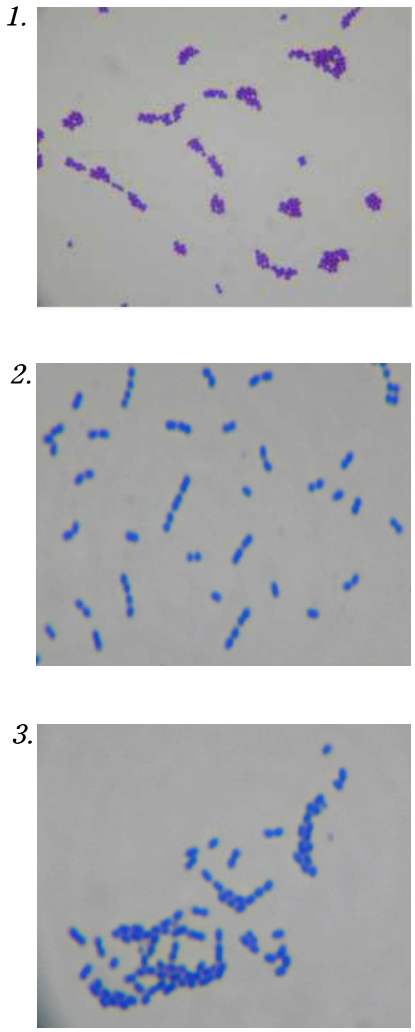

Figure 3. Gram staining of the isolated strains

1. Isolate GJ2, 2. Isolate C3, 3. Isolate C11

Gram stain kit, BD Co., USA

magnification : × 1,000

Table 4. Sugar utilization characteristics of the isolated strains GJ2, C3 and C11

Reaction	*GJ2*	*C3*	*C11*	*Reaction*	*GJ2*	*C3*	*C11*
control	-	-	-	Esculine	+	+	+
Glycerol	-	-	-	Salicine	+	+	+
Erythritol	-	-	-	Cellobiose	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-	Maltose	-	+	+
L-Arabinose	+	+	+	Lactose	-	-	+
Ribose	+	-	+	Melibiose	-	-	+
D-Xylose	-	-	+	Saccharose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	Trehalose	+	-	+
Adonitol	-	-	-	Inuline	-	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	-	Melezitose	-	-	-
Galactose	-	-	+	D-Raffinose	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	Amidon	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	Glycogene	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	β -Gentiobiose	+	+	-
Rhamnose	-	-	-	D-Turanose	+	-	+
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	-	-	-	D-Tagatose	-	-	-
Mannitol	-	+	+	D-Fucose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	L-Fucose	-	-	-
α- Methyl-D-mannoside	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-
α-Methyl-D-Glucoside	+	+	+	L-Arabitol	-	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	Gluconate	+	+	+
Amygdaline	+	+	-	2 keto-gluconate	+	-	+
Arbutine	+	+	+	5 keto-gluconate	+	-	-

Incubation at 30℃ for 48 hours

+ : positive reaction, - : negative reaction

```
   1  CTGTCCCACT TAGACGGCTC CCTCCTTACG GTTAGGCCAC CGGCTTTGGG CATTACAAAC    60
  61  TCCCATGGTG TGACGGGCGG TGTGTACAAG ACCCGGGAAC GTATTCACCG CGGCGTGCTG   120
 121  ATCCGCGATT ACTAGCGATT CCGACTTCGT GCAGTCGAGT TGCAGACTGC AGTCCGAACT   180
 181  GAGACGTACT TTAAGAGATT AGCTCACCTT CGCAGGTTGG CAACTCGTTG TATACGCCAT   240
 241  TGTAGCACGT GTGTAGCCCA GGTCATAAGG GGCATGATGA TCTGACGTCG TCCCCGCCTT   300
 301  CCTCCGGTTT GTCACCGGCA GTCTCGCTAG AGTGCCCATC TGAATGCTGG CAACTAACAA   360
 361  TAAGGGTTGC GCTCGTTGCG GGACTTAACC CAACATCTCA CGACACGAGC TGACGACGAC   420
 421  CATGCACCAC CTGTCACTTT GTCTCCGAAG AGAACACTTC TATCTCTAAA AGCTTCAAAG   480
 481  GATGTCAAGA CCTGGTAAGG TTCTTCGCGT TGCTTCGAAT TAAACCACAT GCTCCACCGC   540
 541  TTGTGCGGGT CCCCGTCAAT TCCTTTGAGT TTCAACCTTG CGGTCGTACT CCCCAGGCGG   600
 601  AACACTTAAT GCGTTAGCTT CGGCACTAAG AGGCGGAAAC CTCCTAACAC CTAGTGTTCA   660
 661  TCGTTTACGG TGTGGACTGC CAGGGTATCT AATCCTGTTT GCTACCCACA CTTTCGAGCC   720
 721  TCAACGTCAG TTACAGTCCA GTAAGCCGCC TTCGCCGCTG GTGTTCTTCC ATATATCTAC   780
 781  GCATTCCACC GCTACACATG GAGTTCCACT TACCTCTACT GCACTCAAGT TGTCCAGTTT   840
 841  CCAATGCCTT TCCGGAGTTG AGCTCCGGGC TTTCACATCA GACTTAAACA ACCGTCTGCG   900
 901  CTCGCTTTAC GCCCAATAAA TCCGGATAAC GCTCGGGACA TACGTATTAC CGCGGCTGCT   960
 961  GGCGCGTATT TACGCGTCCC TTTCTGGTAT GGTACCGTCA CACTAAAATC ATTCCCTATT  1020
1021  CTAGCTGTTC TTCCCATACA ACAGTGCTTT ACGACCCGAA AGCCTTCATC ACACACGCGG  1080
1081  CGTTGCTCCA TCAGGCTTCG CGCCCATTGT GGAAGATTCC CTACTGCAGC CTCCCGTAGG  1140
1141  AGTTTGGGCC GTGTCTCAGT CCCAATGTGG CCGATCAGTC TCTCAACTCG GCTATGCATC  1200
1201  ATTGTCTTGG TGAGCCTTTA CCTCACCAAC TAACTAATGC ACCGCGGATC CATCTCTAGG  1260
1261  TGACGCCGAT AGCGCCTTTT AACTTTATGT CATGCGACAC TAAGCC   1306
```

Figure 4. DNA sequence of the amplified 16S rDNA from isolate GJ2

```
   1  GCGGCGTGCC TAATACATGC AAGTCGAACG CGCAGCGAGA GGTGCTTGCA CCTTTCAAGC    60
  61  GAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGAT AACCTGCCTC AAGGCTGGGG ATAACATTTG   120
 121  GAAACAGATG CTAATACCGA ATAAAACTTA GTATCGCATG ATATCAAGTT AAAAGGCGCT   180
 181  ACGGCGTCAC CTAGAGATGG ATCCGCGGTG CATTAGTTAG TTGGTGGGGT AAAGGCTTAC   240
 241  CAAGACGATG ATGCATAGCC GAGTTGAGAG ACTGATCGGC CACATTGGGA CTGAGACACG   300
 301  GCCCAAACTC CTACGGGAGG CTGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGGCGC AAGCCTGATG   360
 361  GAGCAACGCC GCGTGTGTGA TGAAGGCTTT CGGGTCGTAA AGCACTGTTG TATGGGAAGA   420
 421  AATGCTAAAA TAGGGAATGA TTTTAGTTTG ACGGTACCAT ACCAGAAAGG GACGGCTAAA   480
 481  TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTATG TCCCGAGCGT TATCCGGATT TATTGGGCGT   540
 541  AAAGCGAGCG CAGACGGTTG ATTAAGTCTG ATGTGAAAGC CCGGAGCTCA ACTCCGGAAT   600
 601  GGCATTGGAA ACTGGTTAAC TTGAGTGTTG TAGAGGTAAG TGGAACTCCA TGTGTAGCGG   660
 661  TGGAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA GTGGCGAAGG CGGCTTACTG GACAACAACT   720
 721  GACGTTGAGG CTCGAAAGTG TGGGTAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACACC   780
 781  GTAAACGATG AATACTAGGT GTTAGGAGGT TTCCGCCTCT TAGTGCCGAA GCTAACGCAT   840
 841  TAAGTATTCC GCCTGGGGAG TACGACCGCA AGGTTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGAC   900
 901  CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGCTTAAT TCGAAGCAAC GCGAAGAACC TTACCAGGTC   960
 961  TTGACATCCT TTGAAGCTTT TAGAGATAGA AGTGTTCTCT TCGGAGACAA AGTGACAGGT  1020
1021  GGTGCATGGT CGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTAGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC  1080
1081  AACCCTTATT GTTAGTTGCC AGCATTCAGT TGGGCACTCT AGCGAGACTG CCGGTGACAA  1140
1141  ACCGGAGGAA GGCGGGGACG ACGTCAGATC ATCATGCCCC TTATGACCTG GGCTACACAC  1200
1201  GTGCTACAAT GGCGTATACA ACGAGTTGCC AACCTGCGAA GGTGAGCTAA TCTCTTAAAG  1260
1261  TACGTCTCAG TTCGGACTGC AGTCTGCAAC TCGACTGCAC GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA  1320
1321  TCGCGGATCA GCACGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGGTC   1359
```

Figure 5. DNA sequence of the amplified 16S rDNA from isolate C3

```
   1  GCGGCGTGCC TAATACATGC AAGTCGAACG CACAGCGAAA GGTGCTTGCA CCTTTCAAGT    60
  61  GAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGAC AACCTGCCTC AAGGCTGGGG ATAACATTTG   120
 121  GAAACAGATG CTAATACCGA ATAAAACTTA GTGTCGCATG ACAAAAAGTT AAAAGGCGCT   180
 181  TCGGCGTCAC CTAGAGATGG ATCCGCGGTG CATTAGTTAG TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC   240
 241  CAAGACAATG ATGCATAGCC GAGTTGAGAG ACTGATCGGC CACATTGGGA CTGAGACACG   300
 301  GCCCAAACTC CTACGGGAGG CTGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG   360
 361  GAGCAACGCC GCGTGTGTGA TGAAGGCTTT CGGGTCGTAA AGCACTGTTG TATGGGAAGA   420
 421  ACAGCTAGAA TAGGAAATGA TTTTAGTTTG ACGGTACCAT ACCAGAAAGG GACGGCTAAA   480
 481  TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTATG TCCCGAGCGT TATCCGGATT TATTGGGCGT   540
 541  AAAGCGAGCG CAGACGGTTT ATTAAGTCTG ATGTGAAAGC CCGGAGCTCA ACTCCGGAAT   600
 601  GGCATTGGAA ACTGGTTAAC TTGAGTGCAG TAGAGGTAAG TGGAACTCCA TGTGTAGCGG   660
 661  TGGAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA GTGGCGAAGG CGGCTTACTG GACTGCAACT   720
 721  GACGTTGAGG CTCGAAAGTG TGGGTAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACACC   780
 781  GTAAACGATG AACACTAGGT GTTAGGAGGT TTCCGCCTCT TAGTGCCGAA GCTAACGCAT   840
 841  TAAGTGTTCC GCCTGGGGAG TACGACCGCA AGGTTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGAC   900
 901  CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAAT TCGAAGCAAC GCGAAGAACC TTACCAGGTC   960
 961  TTGACATCCT TTGAAGCTTT TAGAGATAGA AGTGTTCTCT TCGGAGACAA AGTGACAGGT  1020
1021  GGTGCATGGT CGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC  1080
1081  AACCCTTATT GTTAGTTGCC AGCATTCAGA TGGGCACTCT AGCGAGACTG CCGGTGACAA  1140
1141  ACCGGAGGAA GGCGGGGACG ACGTCAGATC ATCATGCCCC TTATGACCTG GGCTACACAC  1200
1201  GTGCTACAAT GGCGTATACA ACGAGTTGCC AACCCGCGAG GGTGAGCTAA TCTCTTAAAG  1260
1261  TACGTCTCAG TTCGGATTGT AGTCTGCAAC TCGACTACAT GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA  1320
1321  TCGCGGATCA GCACGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGGTC   1359
```

Figure 6. DNA sequence of the amplified 16S rDNA from isolate C11

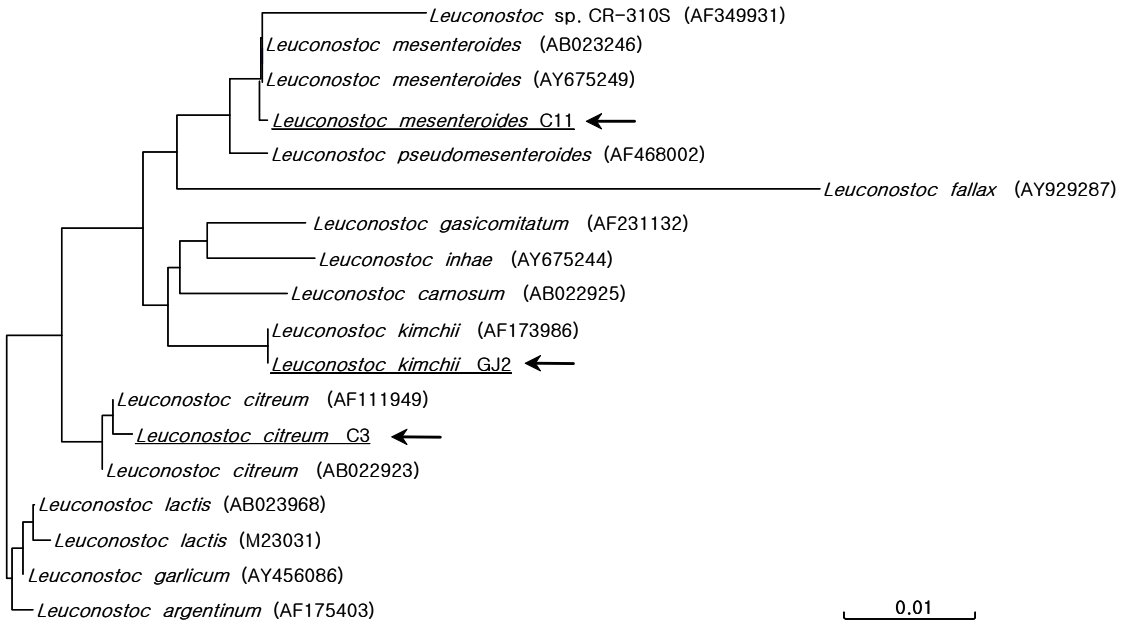

Figure 7. Phylogenetic relationship between Leuconostoc kimchii GJ2, Leuconostoc citreum C3, Leuconostoc mesenteroides C11 and other related bacteria based on 16S rDNA sequence

3. *EPS* 생성균주의 특성

1) 배양시간에 따른 생육도

분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11을 30℃에서 36시간 정치배양하며, 매 3시간마다 흡광도를 측정하여 배양시간에 따른 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. 측정결과 Fig. 8과 같이 3종의 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11는 3시간부터 12시간까지 대수적으로 증가하였으며 12-15시간에서 최대가 되었고, 그 이후에는 정지기로 들어가는 것을 관찰할 수 있었다.

2) 배지의 *NaCl* 농도에 따른 생육도

NaCl이 균주의 성장에 미치는 영향을 검토하기 위해 MRS 액체배지에 NaCl을 0, 1, 3, 5, 7%가 되게 첨가하여 30℃에서 24시간 정치배양하여 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. 측정결과 Fig. 9와 같이 3균주 모두 NaCl 농도 0%에서 3%범위에서 잘 생육하였으며 생육 최적 NaCl 농도는 *Leu. kimchii* GJ2와 *Leu. mesenteroides* C11은 0%이나, *Leu. kimchii* GJ2의 경우 1%에서도 0%와 비슷한 생육도를 보였으며 그 이후로는 점차 감소하는 경향을 보였다. *Leu. citreum* C3는 1%로 NaCl이 적정농도로 첨가되었을 때 더 잘 생육하는 것으로 나타났다.

3) 배지의 초기 *pH*에 따른 생육도

1 N NaOH 또는 1 N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 10.0으로 보정한 MRS 액체 배지에 30℃에서 24시간 정치배양하여 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. 측정결과 Fig. 10과 같이 *Leu. citreum* C3는 pH 6.0에서부터 pH 7.0까지의 범위에서 잘 생육하였으며, 생육 최적 pH는 7.0이었다. *Leu. kimchii* GJ2와 *Leu. mesenteroides* C11은 pH 6.0에서부터 pH 10.0까지의 범위에서도 잘 생육하였으며 생육 최적 pH는 *Leu. mesenteroides* C11은 7.0이었고, *Leu. kimchii* GJ2는 10.0으로 알칼리 영역에서 가장 잘 생육하는 것으로 나타났다.

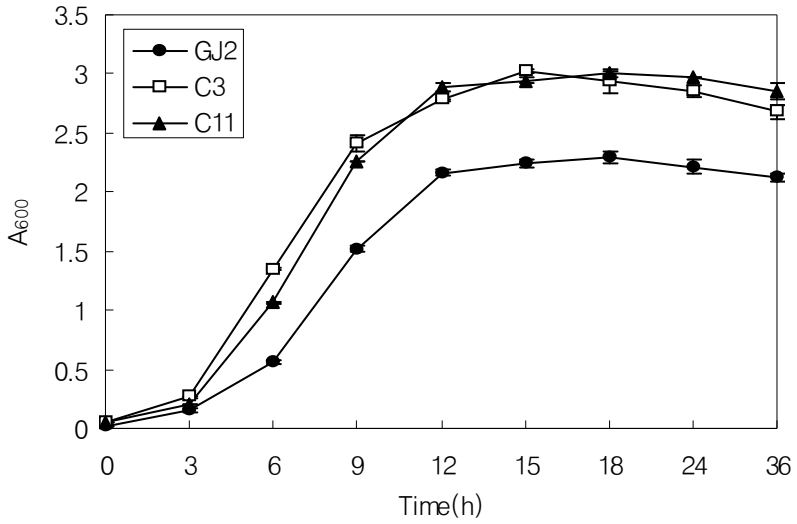

Figure 8. Growth curves Leu. kimchii GJ2 , Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11 in MRS broth at 30℃

All values were mean ± S.E.(n=3)

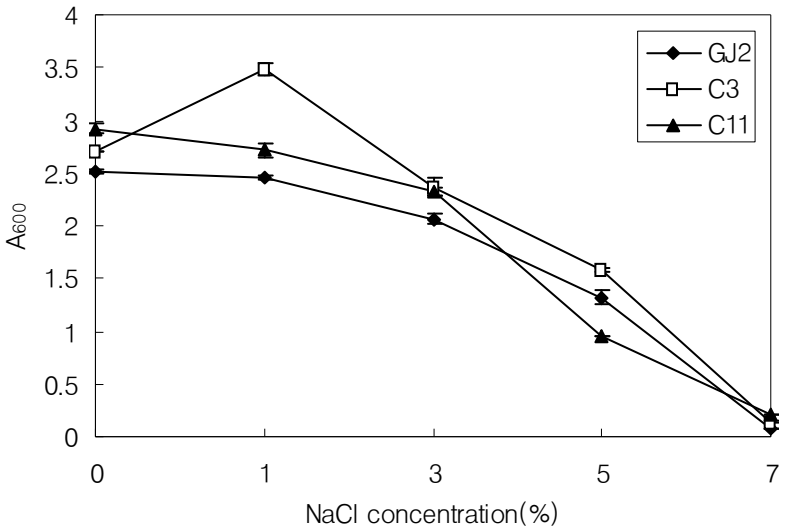

Figure 9. Effects of NaCl of the growth media on the growth of Leu. kimchii GJ2, Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11

Incubation in MRS broth containing 0~7% NaCl at 30℃ for 24 hours

All values were mean ± S.E.(n=3)

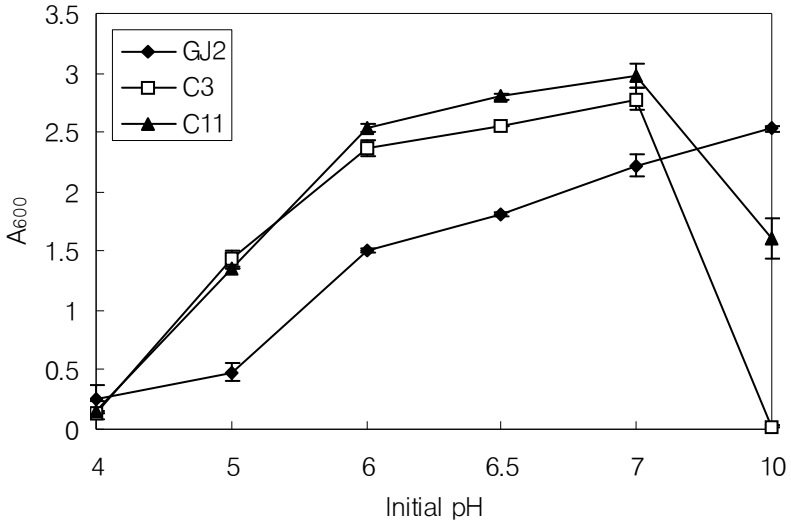

Figure 10. Effects of initial pH of the growth media on the growth of Leu. kimchii GJ2, Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11

Incubation in MRS broth to adjust the pH 4~10 at 30℃ for 24 hours

All values were mean ± S.E.(n=3)

4. 분리균주의 장내 정착성

1) 내산성 및 인공위액 저항성

구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여 생존해야 한다. 따라서 3종의 분리 균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11에 대하여 단순 산성 pH에 대한 내성을 측정하기 위하여 pH 3.0으로 조정한 0.05 M sodium phosphate 용액과 위액에 대한 내성을 알아보기 위하여 pepsin(1,000 unit/mL)이 함유된 인공위액을 제조하여 저항성 시험을 실시하였다. 산 저항성 여부는 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정한 것을 평균치로 나타내었다. 그 결과 Fig. 11, 12에 나타난바와 같이 sucrose 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성한 3종의 분리균주는 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 초기균수(10^8 CFU/mL)를 유지하며 높은 저항성을 나타내었다. 이는 위에서 생존하여 장으로 이동할 수 있다는 가능성을 제시한 결과라 할 수 있겠다. 순수한 위액의 pH는 1.4-2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 되지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인해 위의 pH가 높아진다는 것을(19) 고려한다면 생존율은 더욱 높아질 것으로 사려된다. 반면 대조군으로서 MRS 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우 1-2 log cycle 감소현상을 보이며, 위내에서의 생존 가능성이 분리균주의 EPS 생성으로 인한 균체 보호막 작용에 의한 결과라고 판단하였다.

지금까지 산에 대한 강한 내성을 지님으로써 probiotics로 기능할 수 있는 유산균들이 많이 연구되어졌다. 그러나 이들 균들의 분리원이 동물의 장이나 분변에서 분리한 것이거나 식품에서 분리한 경우도 대부분 발효유제품에서 분리한 것이고, 김치에서 분리한 유산균의 경우는 이 등(45)의 보고가 있지만 인공위액 처리 시 초기 균수 10^9 CFU/mL에서 10^7-10^9 CFU/mL을 나타내며 대체로 1-2 log cycle 감소하며 비교적 낮은 생존율을 보였다. 다른 결과로 김 등(42)이 보고한 김치유산균과 정 등(49)이 보고한 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3의 경우 인공위액 처리 후에도 초기균수

를 유지하며 높은 저항성을 나타내는 보고도 있지만 본 연구의 경우 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 산성 환경에서의 높은 저항성이 EPS 생성으로 인하여 증가되었다는 점에서 볼 때 타 연구와 차별화 할 수 있겠다.

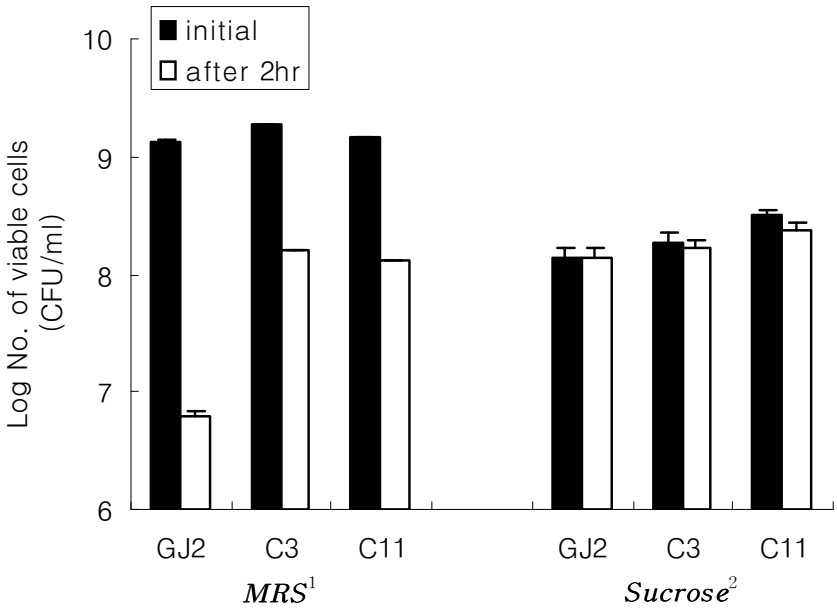

Figure 11. Acid tolerance of the EPS producing isolates in 0.05 M sodium phosphate (pH 3.0)

All values were mean ± S.E.(n=3)

1. Preculture in MRS medium at 30℃ for 24 hours

2. Preculture in sucrose medium at 30℃ for 48 hours

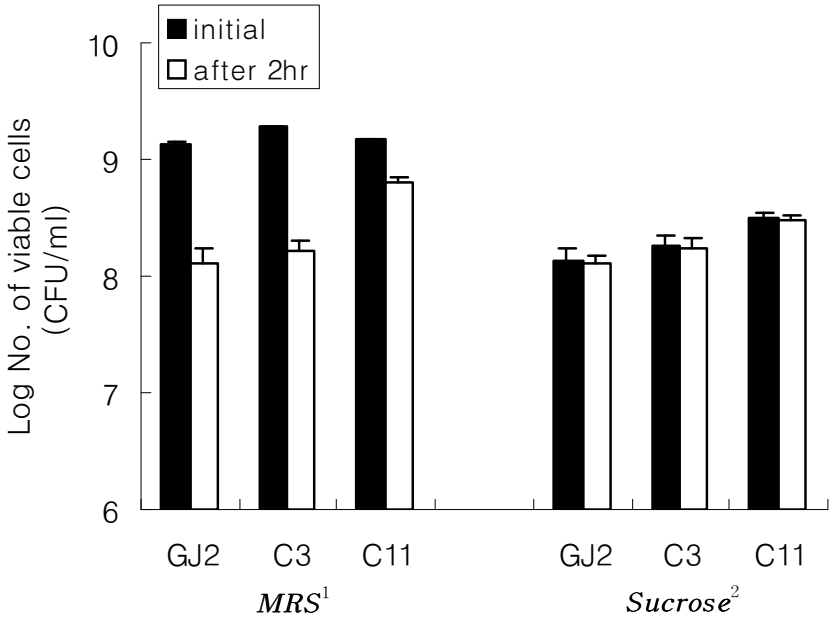

Figure 12. Survival of the EPS producing isolates in artificial gastric juice of pH 3.0

All values were mean ± S.E.(n=3)

1. Preculture in MRS medium at 30℃ for 24 hours

2. Preculture in sucrose medium at 30℃ for 48 hours

2) 인공담즙 저항성

EPS 생성 균주의 인공위액에서의 높은 생존율로 인해 위를 통과하여 장으로 이동할 수 있을 것으로 예측하였다. 위를 거쳐 장에 도달하기 위해서는 그 전에 췌장과 십이지장을 통과하게 되는데, 이 부위에서는 담즙액이 분비된다. 따라서 최종적으로 장내로 들어오기 위해서는 담즙액에 대한 내성 또한 갖추어야 할 중요한 특성이다. Gilliland 등은 probiotic 생균이 가져야할 담즙액에 대한 내성은 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있다고 보고한바 있다(11). 실제로 probiotic 생균으로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6 g/L)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다(15).

인공담즙에 대한 저항성을 측정하기 위하여 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 sucrose 배지에서의 전 배양액과 동일한 상태로 전 배양되어 인공위액 저항성 시험을 거친 배양액을 각각 0.3%(v/v)와 0.5%(v/v) oxgall이 함유된 MRS에 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 저항성 여부는 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정한 것을 평균치로 나타내었다. 그 결과 두 상태의 배양액 모두 0.3%와 0.5% oxgall 함유 인공담즙에서 24시간동안 초기균수를 유지하며 높은 담즙액 저항성을 나타냈다(Fig. 13-15). 정 등(49)이 보고한 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3이 인공위액에서의 저항성이 높은 반면 인공담즙에서의 생존율이 6%로 나타난 점에 비하면 본 연구에서의 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11는 높은 내산성의 기능을 지니면서 동시에 담즙에 대한 높은 저항성을 나타내어 probiotics로의 기능을 갖추었다고 할 수 있다. 반면 대조군으로 MRS 배지에서 전 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우 1-2 log cycle 감소현상을 보이며 분리균주의 EPS 생성으로 인한 효과가 위액에서 뿐만 아니라 높은 농도의 담즙에서도 생존할 수 있음을 보여준다.

따라서 본 실험에서 분리한 EPS 생성균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11은 강산성의 위액과 담즙액에서 생존함으로써 probiotics로서의 기능을 갖추어 목적부위인 장에 도달하여 인체에 정장작용을 할 수 있을 것으로 기대된다.

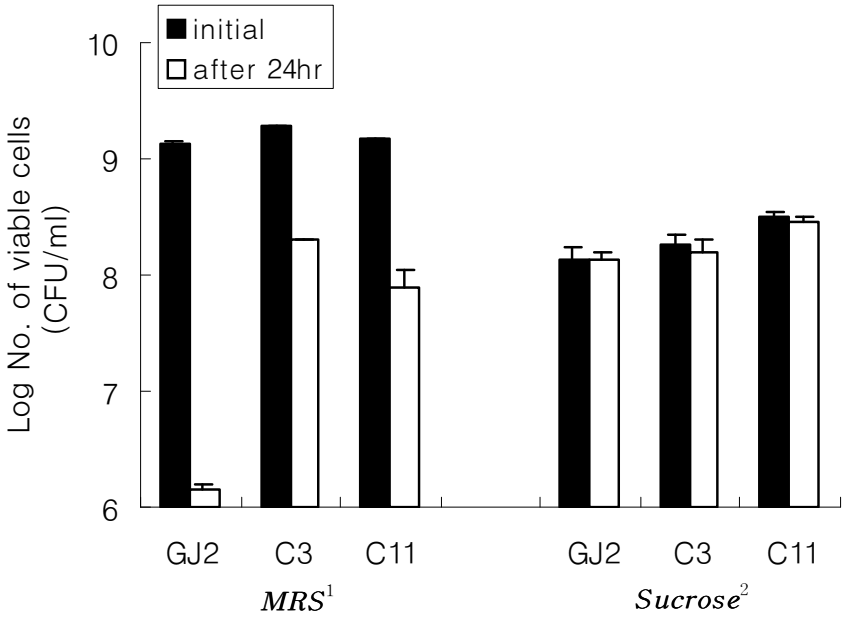

Figure 13. Bile resistance of the EPS producing isolates against 0.3% oxgall

All values were mean ± S.E.(n=3)

1. Preculture in MRS medium at 30℃ for 24 hours

2. Preculture in sucrose medium at 30℃ for 48 hours

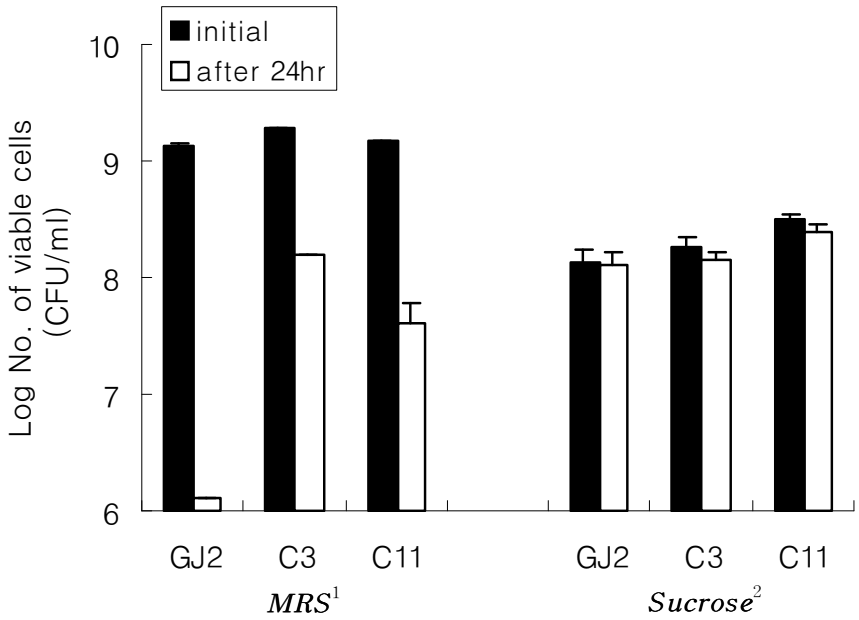

Figure 14. Bile resistance of the EPS producing isolates against 0.5% oxgall

All values were mean ± S.E.(n=3)

1. Preculture in MRS medium at 30℃ for 24 hours

2. Preculture in sucrose medium at 30℃ for 48 hours

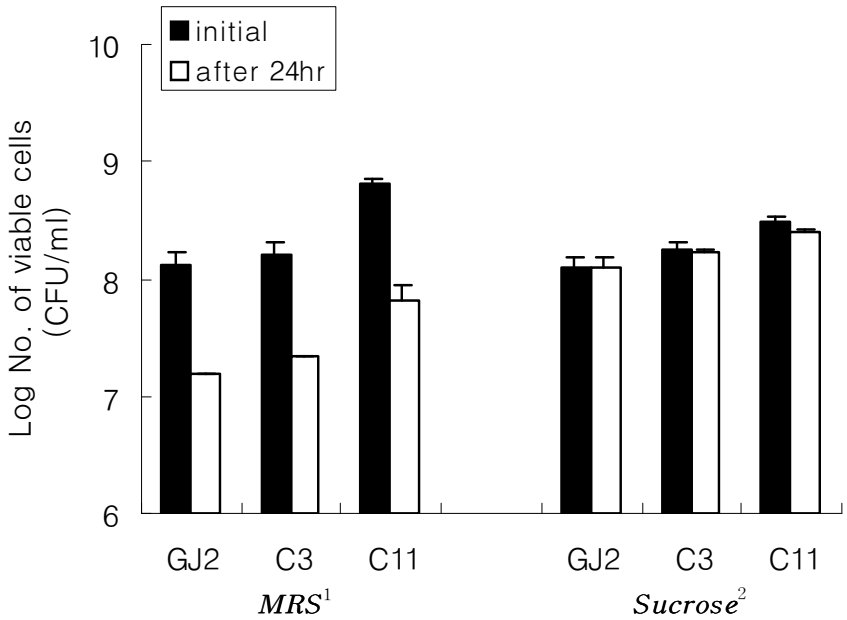

Figure 15. Bile resistance of the EPS producing isolates against 0.3% oxgall after treatment for 2 hours in artificial gastric juice of pH 3.0

All values were mean ± S.E.(n=3)

1. Preculture in MRS medium at 30℃ for 24 hours

2. Preculture in sucrose medium at 30℃ for 48 hours

5. *EPS*의 특성 규명

1) 분리 및 정제

분리균주를 sucrose 액체배지에 1% 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후, 회수한 점질성의 상징액에 2배량의 에탄올을 가하여 침전시킴으로서 crude EPS를 얻었다.(Table 5) EPS의 생성량은 분리균주를 각각 3번씩 배양하여 회수한 EPS를 정량하여 평균치로 나타냈다. 이는 기존에 보고되어진 유산균으로부터 생성된 EPS가 1~2 g/L정도(9, 34, 47, 50)에 그치는 반면 본 연구에서의 분리 균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 경우 탄소원으로 유일하게 sucrose를 이용하여 각각 21.49 g/L, 16.46 g/L, 22.98 g/L로 10배 이상의 높은 생산량을 보이며 산업적으로 활용할 경우 그 이용가치가 훨씬 크다고 할 수 있겠다. *Leu. mesenteroides* PCSIR-3이 미량원소 성분으로 K_2HPO_4, NaCl, $MnSO_4 \cdot H_20$, $FeSO_4 \cdot H_2O$존재하에서 3.48 g/100 mL의 EPS생성량을 나타내는 보고가(41) 있지만 탄소원으로 10%의 sucrose를 사용했을 때의 결과이며, 특히 김치에서 분리한 유산균에서의 EPS 생성에 관한보고는 엄 등(14)에 의한 동치미에서의 고활성 dextransucrase를 생성하는 *Leu. mesenteroides*가 sucrose 존재 시 dextransucrase를 분비하여 dextran을 생성하고 또한 당 전이 반응에 의해 isomaltooligosaccharide를 생성하는데, 이에 관여하는 dextransucrase의 활성에 관한 보고정도이며 김 등(4)에 의한 김치로부터 dextran생성 *Leu. lactis* 분리에 관한 보고가 있으나 이는 dextran 생성능이 없다고 알려진 *Leu. lactis*에서 dextran을 생성하는 *Leu. lactis*를 분리한 것에 대한 보고로 생성 dextran에 관한 연구는 이루어지지 않았다.

EPS의 물질 규명을 위하여 최종농도 4%의 trichloroacetic acid로 단백질을 제거한 상징액에 에탄올을 가하여 분리한 EPS를 물에 녹여 dialysis를 통해 저염분자와 유리당을 제거함으로서 정제하였다. 정제 EPS는 분리균주를 각각 3번씩 배양하여 회수한 것을 정량하여 평균치로 나타냈다. *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터 분리된 정제 EPS는 각각 14.61 g/L, 7.73 g/L, 4.77 g/L로

단순 에탄올 침전으로 회수한 EPS보다 약 1.5~5배 정도 감소량을 보였으나(Table 5) 이러한 결과는 *S. thermophilus*의 경우 50-350 ㎎/L의 생성능을 나타냈다는 Cerning 등(3)의 결과와 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*가 164-263 ㎎/L정도의 EPS 생성능을 나타냈다는 Zhennai Yang의 결과(50) 및 *Lactobacillus* ssp. SCU-M의 EPS 생성능이 1,680 ㎎/L였다고 보고된 결과(18)보다 높은 EPS 생성량을 보였고, T. Smitinont 등(47)이 보고한 *Pediococcus pentosaceus*에서 2.5와 6.0 g/L의 EPS를 생성한 것에 비해서도 높은 생산량이라 할 수 있겠다.

정제된 EPS의 총 당과 총 단백질 함량은 3번씩 반응시켜 측정한 결과를 평균하여 백분율로 나타내었다. 총 당 함량은 *Leu. kimchii* GJ2가 96.48% w/w로 가장 높게 나타났으며 다음으로 *Leu. mesenteroides* C11이 91.05% w/w, *Leu. citreum* C3가 89.38% w/w순으로 나타났으며, 단백질 함량은 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11이 각각 0.8% w/w, 0.9% w/w, 0.95% w/w로 아주 소량으로서 서로 비슷하게 나타났다(Table 5).

Table 5. EPS production by Leu. kimchii GJ2, Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11 in sucrose broth at 30℃ for 48 hours

Culture	EPS(g/L)		Total sugar (g%)	Total protein (g%)
	1	2		
Leu. kimchii GJ2	21.49(±0.46)*	14.61(±0.09)	96.48(±0.49)	0.8(±0.26)
Leu. citreum C3	16.46(±0.79)	7.73(±0.09)	89.38(±0.33)	0.9(±1.04)
Leu. mesenteroides C11	22.98(±0.72)	4.77(±0.08)	91.05(±0.28)	0.95(±0.45)

*Values are mean ± S.E.(n=3)

1. Isolation of EPS by ethanol precipitation

2. Purified EPS

2) 구성 당 확인

EPS의 구성 당을 확인하기 위하여 산 가수분해한 EPS를 TLC와 HPLC를 사용하여 분석하였다. TLC분석은 산 가수분해물을 TLC plate에 1 μL 점적하여 전개용매(acetone : butanol : water, 4 : 5 : 2)에 2번 전개하고 0.5% α-naphthol과 5% 황산이 함유된 에탄올로 발색시킨 결과 표준당과 함께 3종의 분리균주에서의 EPS spot을 확인할 수 있었다. 분리균주에서 생성된 EPS의 경우 3종 모두 표준당으로 사용한 glucose와 같은 전개율로 1개의 spot을 나타내어 1차적으로 glucose로만 이루어진 homo형의 EPS로 추정할 수 있었다(Fig. 16). 보다 정확한 분석을 위해 산 가수분해물을 HPLC로 분석하였으며(Fig. 17), *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터 가수분해 된 EPS는 3종 모두 표준 당으로 사용한 glucose와 같은 retention time의 단일 peak만을 나타내어 본 3종의 분리균주 모두 glucose로만 이루어진 homo형의 EPS를 생성함을 확인할 수 있었다.

따라서 본 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11에서의 EPS는 다른 구성 당은 전혀 없고, glucose로만 구성되어 중합체를 형성하는 homo형의 polysaccharides인 것으로 결정되었다.

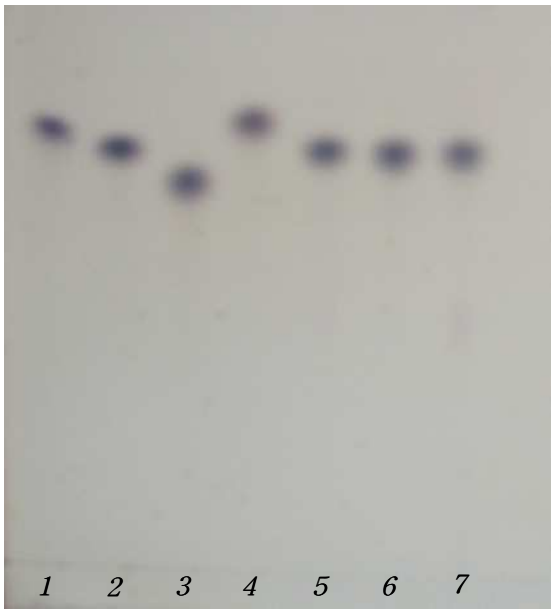

Figure 16. Thin layer chromatogram after acid hydrolysis of the EPS produced by Leu. kimchii GJ2, Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11

Lane 1 : purified of fructose

Lane 2 : purified of glucose

Lane 3 : purified of galactose

Lane 4 : purified of mannose

Lane 5 : acid hydrolysis product of EPS from *Leu. kimchii* GJ2

Lane 6 : acid hydrolysis product of EPS from *Leu. citreum* C3

Lane 7 : acid hydrolysis product of EPS from *Leu. mesenteroides* C11

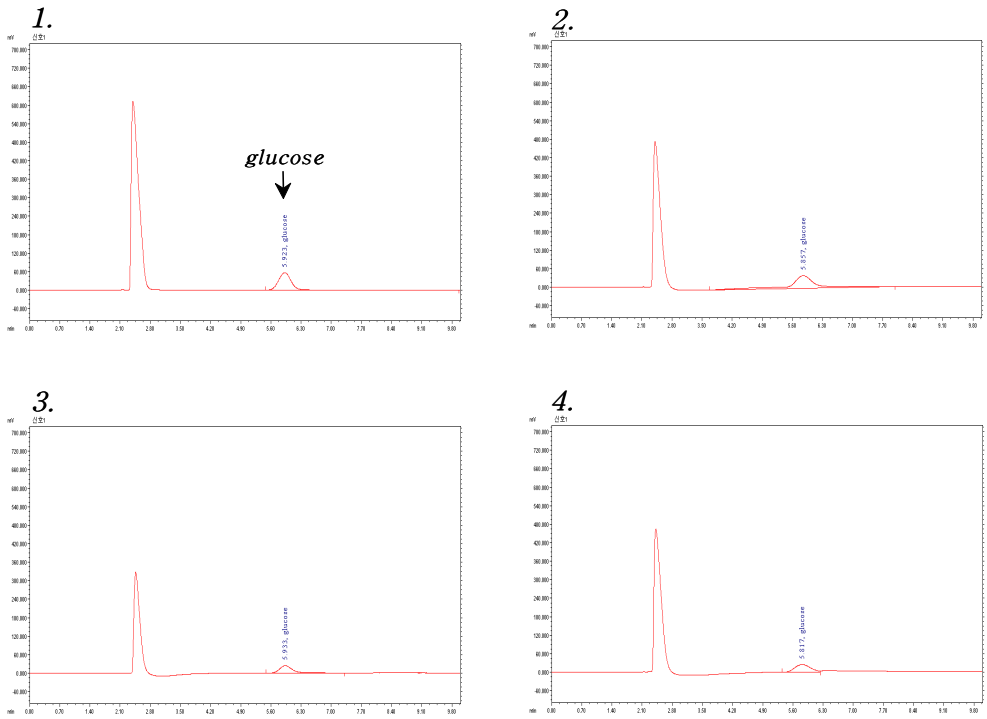

Figure 17. HPLC chromatogram after acid hydrolysis of the EPS produced by Leu. kimchii GJ2, Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11

1. purified of glucose
2. acid hydrolysis product of EPS from *Leu. kimchii* GJ2
3. acid hydrolysis product of EPS from *Leu. citreum* C3
4. acid hydrolysis product of EPS from *Leu. mesenteroides* C11

3) 점도

분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터의 EPS가 모두 같은 종류의 당(glucose)으로 구성되었음에도 불구하고 서로 다른 형태의 EPS를 생성하였다. 3종의 분리균주를 sucrose 고체배지에서 배양하면 *Leu. kimchii* GJ2의 경우 물엿정도의 흐름을 가지는 투명한 형태의 EPS를 생성하고 *Leu. citreum* C3는 불투명하면서 끈끈한 형태의 EPS를 생성하며, *Leu. mesenteroides* C11에서는 불투명 하면서 묽게 퍼지는 형태를 나타낸다. 따라서 분리균주의 sucrose 배양 상징액과 에탄올 침전하여 회수한 crude EPS, 정제 EPS에 대해 점도를 측정해 보았다. 점도는 각각의 EPS를 3번씩 준비하여 측정한 결과를 평균치로 나타내었다. 50 mL sucrose 배양액을 사용하여 각각의 상태별 EPS의 점도를 측정한 결과(Table 6) 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 배양 상징액은 각각 13.03 cp, 7.31 cp, 2.21 cp였으며, crude EPS에서는 각각 482.15 cp, 139.25 cp, 5.39 cp, 정제 EPS에서는 각각 4,662 cp, 3,633 cp, 3.67 cp로 전반적으로 *Leu. kimchii* GJ2로부터의 EPS가 가장 높은 점도를 나타냈으며, *Leu. mesenteroides* C11로부터의 EPS가 가장 낮은 점도를 보였다. 그러나 이와 같은 결과는 각 분리균주로부터의 EPS 생성량에 따른 차이가 점도에 영향을 미쳤을 수 있으므로 각각의 분리균주로부터의 crude EPS와 정제 EPS를 동일농도(4% w/v)로 조정한 것에 대해서도 점도를 측정하였다. 그 결과 *Leu. citreum* C3에서의 crude EPS와 정제 EPS가 각각 136.3 cp, 3,719 cp로 가장 높은 점도를 나타냈고, *Leu. kimchii* GJ2의 경우 각각 119.4 cp, 266.3 cp였으며, *Leu. mesenteroides* C11은 각각 3.57 cp, 6.07 cp로 비교적 큰 차이를 보이며 가장 낮은 점도를 나타냈다. 이와 비슷한 결과로 Elisabeth J.의 연구(8)에 의하면 *Streptococcus thermophilus* Rs 와 Sts에서 생성된 EPS의 경우 galactose와 rhamnose가 5 : 2로 구성되어 같은 구조를 형성하지만 *Streptococcus thermophilus* Rs는 non-ropy한 EPS를 *Streptococcus thermophilus* Sts는 ropy한 EPS를 생성하는데, 이는 두 균주로부터 생성된 EPS의 분자량(Rs: 2.6×10^3 kDa, Sts: 3.7×10^3 kDa)의 차이에 의한 결과라고 보고하였다. 한편, 점도차이의 다른 요인으로서 생성 EPS들간의 결합구

조의 차이를 생각해 볼 수 있다. 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터의 EPS는 glucose를 구성당으로 하는 glucan type의 homopolysaccharide로 나타났다. 유산균으로부터 생성된 homopolysaccharide 중 glucan type으로는 dextran, mutan, alternan등이 있으며 주로 α-1,6, α-1,3, α-1,4 및 α-1,2 glucosidic 결합으로 구성된다(40). dextran의 경우 95%의 α-1,6결합으로 구성된 직선의 polysaccharose이며 α-1,2, α-1,3, α-1,4가 가지를 이루는 경우 각각 dextran A, dextran B, dextran C가 된다. mutan은 50%이상의 α-1,3 glucosidic 결합을 형성하는 수용성 glucan이며 alternan은 α-1,6과 α-1,3 glucosidic 결합이 교대로 구성되어 있다(40). 결합구조의 차이로 인해 서로 다른 특성의 다양한 glucan들이 존재한다. Jeanes 등(20)의 보고에 의하면 *Leu. mesenteroides* NRRL B-1355가 두가지 형태의 polysaccharide를 생성하는데 하나는 약간의 수용성을 띄는 polysaccharide(fraction L)이고 다른 하나는 수용성 polysaccharide(fraction S)로 fraction L의 경우 *Leu. mesenteroides* NRRL B-512F로부터 생성된 dextran과 유사한 95% α-1,6 glucosidic 결합에 5% α-1,3 가지로 구성된 polysaccharide였으며, fraction S는 alternan으로 이루어졌다고 보고한바 있다.

따라서 본 연구에서 분리한 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터 생성된 EPS의 점도차이는 이들의 결합구조와 분자량의 차이에 의한 것으로 생각되어진다.

Table 6. Viscosity of the fermentation medium and EPS solution by Leu. kimchii GJ2, Leu. citreum C3 and Leu. mesenteroides C11 in 50 mL sucrose broth at 30℃ for 48 hours

Culture	*fermentation medium (centipoise)*	*EPS extracted (centipoise)*			
		1	2	3	4
Leu. kimchii GJ2	13.03 (±0.22)*	482.15 (±7.25)	119.4 (±0.06)	4,662 (±9.07)	266.3 (±0.5)
Leu. citreum C3	7.31 (±0.04)	139.25 (±0.25)	136.3 (±0.03)	3,633 (±10.97)	3,719 (±3.0)
Leu. mesenteroides C11	2.21 (±0.15)	5.39 (±0.05)	3.57 (±0)	3.67 (±0.06)	6.07 (±0.02)

*Values are mean ± S.E.(n=3)

1. Isolation of EPS by ethanol precipitation dissolved in 20 mL water
2. 4% solution of EPS by ethanol precipitation
3. Purified EPS dissolved in 10 mL water
4. 4% solution of purified EPS

제 4 장 결 론

유산균(Lactic acid bacteria)생성 exopolysaccharides(EPS)는 세포벽의 일부로서 세포벽 주위에 협막을 형성하거나 세포벽 외부에 slime형태로서 발효중에 축적되는 다당류로, 1차 또는 2차 대사산물이다. 이는 에너지원으로 이용되는 것은 아니고 건조, 식균작용, 원생동물의 습식, 항생제, 독성화합물, 삼투압 스트레스 등과 같은 외부환경으로부터 자신을 보호하는 작용을 한다. 균체에서 이러한 EPS의 역할에 착안하여 본 연구에서는 EPS생성 유산균의 경우 probiotics 기능성을 나타낼 것으로 기대하였다. probiotics는 항박테리아제로 숙주의 장내에서 유익한 미생물 균총을 만들 수 있는 것으로 최근 주목받고 있는 유산균의 특징이다. 뿐만 아니라 지금까지의 EPS특성 연구와 EPS생성 유산균 및 probiotics에 관한 많은 보고들이 거의 발효유제품에서 분리한 유산균에서의 연구인 반면, 본 연구에서는 우리나라 고유의 채소발효식품인 김치로부터 분리한 유산균 중 EPS 생성균주를 선별하여 장내정착성 여부를 확인하고 생성 EPS의 특성을 규명하고자 하였다.

김치로부터 분리한 3종의 김치유산균을 Gram염색을 비롯한 형태학적 특성과 생화학적 특성 및 16S rDAN 염기서열을 통하여 동정한 결과 각각 *Leuconostoc kimchii, Leuconostoc citreum, Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었으며, *Leuconostoc kimchii* GJ2, *Leuconostoc citreum* C3, *Leuconostoc mesenteroides* C11로 명명하였다.

EPS생성 김치유산균의 장내 정착성 여부 확인을 위하여 내산성, 인공위액 및 인공담즙에서 처리한 결과 pH 3.0의 0.05 M sodium phodphate buffer와 인공위액에서 2시간 처리한 후에도 3균주 모두 초기균수(10^8 CFU/mL)를 유지하면서 높은 저항성을 나타내었다. 뿐만 아니라 Oxgall 농도 0.3%와 0.5%의 인공담즙에서 24시간 처리한 후에도 3균주 모두 초기균수(10^8 CFU/mL)를 유지하였으며, 인공담즙 저항성 시험의 경우

위액에서 생존시 위를 통과하여 장으로 이동할 것임을 고려하여 인공위액에서 생존한 균주를 동일조건의 인공담즙에서 처리하였을 때에도 3균주 모두 초기균수를 유지하면서 담즙에 대해서도 높은 저항성을 나타내었다. 이 결과로 인해 본 연구에서 분리한 3종의 EPS생성 김치유산균 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11은 장내 정착하면서 probiotics로서 작용할 수 있을 것임을 확인하였다. 반면, 대조군으로서 MRS 배양액을 사용하여 동일하게 처리한 결과 내산성, 인공위액, 인공담즙에서 처리 후 1~2 log cycle 감소현상을 보이며 균체의 EPS생성 여부가 probiotics로서 기능할 수 있는데 결정적 요인임을 보여주었다.

생성된 EPS의 특성을 규명하기 위하여 먼저 crude EPS를 분리하여 정량한 결과 EPS생성 김치유산균 *Leu. kimchii* GJ2 , *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11은 각각 21.49 g/L, 16.46 g/L, 22.98 g/L의 EPS 생산량을 보였으며 정제하였을 때에도 각각 14.61 g/L, 7.73 g/L, 4.77 g/L의 생산량을 보이며 기존의 EPS 생성 유산균에서의 생산량에 비해 10배 이상의 높은 생산량을 나타내었다. *Leu. kimchii* GJ2 , *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 총 당 확인 결과 각각 96.48%, 89.38%, 91.05%였으며, 총 단백질은 0.8%, 0.9%, 0.95%로 확인되었다. EPS 구성 당 확인을 위하여 가수분해한 시료를 TLC 및 HPLC로 분석한 결과 3균주 모두 glucose로만 구성된 homopolysaccharides로 확인되었다. 3종의 EPS 생성 김치유산균 *Leu. kimchii* GJ2 , *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11에서 생성한 EPS가 구성 당이 같음에도 불구하고 각각 서로 다른 형태를 나타내어 그 점도를 측정한 결과 동일농도(4% w/v)의 crude EPS와 정제 EPS에 대해서 *Leu. citreum* C3가 각각 136.3 cp, 3,719 cp로 가장 높은 점도를 보였고, 그 다음으로 *Leu. kimchii* GJ2가 각각 119.4 cp, 266.3 cp였으며, *Leu. mesenteroides* C11은 각각 3.57 cp, 6.03 cp로 비교적 큰 차이를 보이며 가장 낮은 점도를 나타냈다. 3종의 분리균주에서 생성된 EPS 형태와 점도의 차이는 아마도 EPS의 분자구조와 분자량의 차이에 기인한 것으로 추측되어 진다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Alan D. Welman and Ian S. Maddox. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology. 21(6):269-274(2003)

2. Andrew Laws, Yucheng Gu, Valerie Marshall. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnology Advances. 19:597-625(2001)

3. Baek YJ. Lactic acid bacteria and human health. Korean J. Food Nutr. 6:53-65(1993)

4. Bong-Joon Kim, Bong-Hee Min, Jeongho Kim and Hong-Ui Han. Isolation of Dextran-producing *Leuconostoc lactis* from Kimchi. Journal of Microbiology. 39(1):11-16(2001)

5. Cerning, J., C. Bouilanne, M. Desmazeaud and M. Landon. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 10:255-260(1998)

6. Chong-Jin Park, Jeong-Soo Pyeon, Yun-Kyung Cho, Seung-Suh Hong and Hyun-Soo Lee. Characteristics of *Enterococcus* sp. Isolated from Animal Intenstine and Its Powder. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.

24(4):393-398(1996)

7. Dae-Jin Kim and Shin-Young Lee. Isolation of Exopolysaccharide Producing *Enterobacter* sp. and Physicochemical Properties of the Polysaccharide Produced by This Strain. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 16(4):370-375(2001)

8. Elisabeth J. Faber, Poeternella Zoon, Johannis P. Kamerling, Johannes F.G. Vliegenthart. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. Carbohydrate Research. 310:269-276(1998)

9. Frederik Vaningelgem, Medana Zamfir, Fernanda Mozzi, Tom Adriany, Marc Vancanneyt, Jean Swings and Luc De Vuyst. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains Is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 70(2):900-912(2004)

10. George R. Schacterle and Robert L. Pollack. A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amounts of Protein in Biologic Material. Anal. Biochem. 51:654-655(1973)

11. Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophillus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67:3045-3051(1984)

12. Ho-Jin Kang, Seung-Chun Baick and Ja-Hyun Yu. Studies on the Properties of the Stirred Yogurt Manufactured by Exopolysaccharide Producing Lactic Acid

Bacteria. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 25(1):84-91(2005)

13. Hong-Suk Park, Sun-Hee Lee and Tai-Boong Uhm. Selection of Microorganisms for Probiotics and Their Characterization. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27(3):433-440(1998)

14. Hyun-Ju Eom, Dong Mi Seo, Hyang Sik Yoon, Hee Bong Lee and Nam Soo Han. Strain Selection of Psychrotrophic *Leuconostoc mesenteroides* Producing a Highly Active Dextransucrase from Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 34(6):1085-1090(2002)

15. Hyun-Dong Paik, Min-Yong Jung, Hwang-Young Jung, Won-Seok Kim and Kee-Tae Kim. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for Oral Bacteriotherapy of Gastrointestinal Disorders. Korean J. Food Sci. Technol. 34(1):73-78(2002)

16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi

17. Ian W. Sutherland. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends in Biotechnology. 16:41-46(1998)

18. Inhyu Bae and Jeong-Weon Huh. Isolation of *Lactobacillus* ssp. Producing Exopolysaccharide and Optimization of its Production. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 17(2):169-175(2002)

19. Jae-Hun Sim, Se-Jong Oh, Sang-Kyo Kim and Young-Jin Baek. Comparative Tests on the Acid Tolerance of Some Lactic Acid Bacteria Species Isolated

from Lactic Fermented Products. Korean J. Food Sci. Technol. 27(1):101-104(1995)

20. Jeanes, A., Haynes, W. C., Williams, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., Cluskey, J. E., Fisher, B. E., Tsuchiya, H. M., Rist, C. E.. Characterization and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. Journal of the American Chemical Society. 76:5041-5052(1954)

21. Jin-Ha Lee, Hyoung-Woo Lee, Hyoung-Ki Lee, Dong-Lyun Cho, Chang-Sin Sunwo, Ki-Deok Park, Jeong-Shik Choi, Do-Won Kim, Doman Kim. Simple and Quantitative Analysis Method for Total Carbohydrate Concentration in Oligosaccharides by using TLC. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 19(4):269-273(2004)

22. John F. Robyt. Essentials of Carbohydrate Chemistry. Springer advanced texts in chemistry. 1998. pp.345-347.

23. Jong-Gil Park, Suk-Young Yun, Sejong Oh, Jung-Gul Shin and Young-Jin Baek. Probiotic Characteristics of Lactobacillus acidophilus KY1909 Isolated from Korean Breast-Fed Infant. Korean J. Food Sci. Technol. 35(6):1244-1247(2003)

24. Jung HK, Kim ER, Yae HS, Choi SJ, Jung JY, Juhn SL. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic funtional foods. Food Ind. Nutr. 5:29-35(2000)

25. Jutta Cerning. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria.

FEMS Microbiology Reviews. 87:113-130(1990)

26. Kato I, Endo K, Yokokura T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. Int. J. Immunopharmacol. 16:29-36(1994)

27. Kim HS, Ham JS. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 23:186-192(2003)

28. Kimmel, S. A., R. F. Roberts and G. R. Ziegler. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. Appl. Environ. Microbiol. 64:659-664(1998)

29. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. Studies on biological characteristics of Lactobacillus: Ⅱ. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, L. casei PSR3002, to artificial digestive fluids. Jpn. J. Microbiol. 29:691-698(1974)

30. Lan-Szu Chou and Bart Weimer. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acdophilus*. Journal of Dairy Science. 82:23-31(1999)

31. Laura Selbmann, Silvano Onofri, Massimiliano Fenice, Federico Federici, Maurizio Petruccioli. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. Research in Microbiology. 153:585-592(2002)

32. Luc De Vuyst, Bart Degeest. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 23:153-177(1999)

33. Luc De Vuyst, Filip De Vin, Frederik Vaningelgem, Bart Degeest. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 11:687-707(2001)

34. Marie-Rose VAN Calsteren, Corinne Pau-Rblot, Andre Begin and Denis Roy. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. Biochem. J. 263:7-17(2002)

35. Michel Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chemistry. 28:350-356(1956)

36. M. S. Shin, J. J. Lee, S. H. Na, H. S. Bae, C. S. Huh and Y. J. Baek. Characteristics of *Bifidobacterium* spp. Isolated from Korean Feces for Probiotics. Korean J. Dairy Sci. 20(4):273-282(1998)

37. Park, Choon-Sang and Cherl-Ho Lee. Effect of Reaction Time on the Rheological Properties of Dextran Formed Solution Produced by Crude Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* Sikhae. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20(3):316-323(1992)

38. Patricia Ruas-Madiedo, Jeroen Hugenholtz, Pieternela Zoon. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 12:163-171(2002)

39. Philippe Duboc, Beat Mollet. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal. 11:759-768(2001)

40. Pierre Monsan, Sophie Bozonnet, Cecile Albenne, Gilles Joucla, Rene-Marc Willemot, Magali Remaud-Simeon. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 11:675-685(2001)

41. Seon-Jae Kim. Physicochemical Characteristics of Yogurt Prepared with Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. Korean J. Food Culture. 20(3):337-340(2005)

42. Seon-Jae Kim. Potential Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated form Kimchi. Food Sci. Biotechnol. 14(4):547-550(2005)

43. Shah Ali UI-Qader, Lubna Iqbal, Husan Afroz Rizvi and Rabia Zuberi. Production of dextran from sucrose by a newly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides (PCSIR-3)* with reference to *Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F*. Biotechnol. Appl. Biochem. 34:93-97(2001)

44. Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S, Kaminogawa S. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. Int Arch. Allergy Immunol. 115:278-287(1998)

45. Shin-Ho Lee, Myung-Ja No. Viablility in Artificial Gastric and Bile Juice and Antimicrobial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25(6):617-622(1997)

46. T. R. Shamala and M. S. Prasad. Preliminary Studies on the Production of High and Low Viscosity Dextran by *Leuconostoc* spp.. Process Biochemistry. 30(3):237-241(1995)

47. T. Smitinont, C. Tansakul, S. Tanasupawat, S. Keeratipibul, L. Navarini, M. Bosco, P. Cescutti. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. International Journal of Food Microbiology. 51:105-111(1999)

48. Vittorio Crescenzi. Microbial Polysaccharides of Applied Interest: Ongoing Research Activities in Europe. Biotechnol. Prog. 11:251-259(1995)

49. Won-Bok Chung, Won-Seok Soe, Jae-Young Cha and Young-Su Cho. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for Probiotics Production from Korean Dongchimi. Korean Journal od Food Preservation. 10(3):406-410(2003)

50. Zhennai Yang, Eine Huttunen, Mikael Staaf, Goran Widmalm, Heikki Tenhu. Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-froming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. International Dairy Journal. 9:631-638(1999)